

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **03-277276**

(43)Date of publication of application : **09.12.1991**

(51)Int.CI.

C12N 9/10
A23C 9/152
C12P 19/18
//(C12N 9/10
C12R 1:01)

(21)Application number : **02-246792**

(71)Applicant : **SUNTORY LTD**

(22)Date of filing : **17.09.1990**

(72)Inventor : **NAKAYAMA TORU
KODAMA YUKIKO
AMANO NORIHIDE
NAKAO MASAHIRO
SHIBANO YUJI
AMACHI TERUO**

(30)Priority

Priority number : **02 64318** Priority date : **16.03.1990** Priority country : **JP**

(54) NOVEL HEAT-RESISTANT BETA-GALACTOSYL GROUP TRANSFERASE, PREPARATION AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To prepare a β -galactosyl group transferase having high heat stability by culturing a specific microorganism belonging to the genus *Actinomyces* and subsequently separating the transferase from the cultured product.

CONSTITUTION: A microorganism belonging to the genus *Actinomyces* and producing a β -galactosyl group transferase having the following physicochemical properties is cultured. The objective novel β -galactosyl group transferase is separated and obtained from the cultured product. The physicochemical properties of the enzyme: (i) the action: [transition reaction]; 1 mole of a novel β -D- galactosylpyranoside Gal-Y and 1 mole of X are produced from 1 mole of β -D- galactosylpyranoside Gal-X and 1 mole of a galactosyl group acceptor Y wherein both X and Y are saccharides or aglycons excluding water, [hydrolysis]; 1 mole of β -D-galactosylpyranoside Gal-X is hydrolyzed to produce 1 mole of X and 1 mole of galactose. (ii) The optimal pH is 5.0-8.0. (iii) The stability of pH is stable at a pH of 5-8 when treated at 55°C for 15 minutes, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of
rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報 (A) 平3-277276

⑬ Int. Cl. 5

C 12 N 9/10
A 23 C 9/152
C 12 P 19/18

識別記号

序内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)12月9日

7823-4B
6977-4B
8214-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全16頁)

⑭ 発明の名称 新規耐熱性 β -ガラクトシル基転移酵素、その製造法及びその用途

⑭ 特願 平2-246792

⑭ 出願 平2(1990)9月17日

優先権主張 ⑭ 平2(1990)3月16日 ⑭ 日本 (JP) ⑭ 特願 平2-64318

⑮ 発明者 中山 亨 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内

⑮ 発明者 児玉 由紀子 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内

⑮ 発明者 天野 典英 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内

⑯ 出願人 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

⑯ 代理人 弁理士 小野 信夫

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

新規耐熱性 β -ガラクトシル基転移酵素、
その製造法及びその用途

2. 特許請求の範囲

(1) 下記の理化学的性質をもつ新規 β -ガラクトシル基転移酵素。

① 作用

転移反応:

β -D-ガラクトビラノシド
Gal-X 1モルと、ガラクトシル基
受容体Y 1モルとから、あらたな β -D-ガラクトビラノシド Gal-Y
1モルと、X 1モルを生成する。

ここで、X、Yはいずれも水以外の
化合物で、備あるいはアグリコンで
ある。

加水分解:

1モルの β -D-ガラクトビラノシ

ド Gal-X を加水分解し、1モルの
Xと1モルのガラクトースを生成す
る。

② 基質特異性

ラクトースおよび β -ニトロフェニル
- β -D-ガラクトビラノシドを加水
分解するが、 β -ニトロフェニル- α
- D-ガラクトビラノシドは加水分解
しない。

③ 至適 pH

5.0 ~ 8.0

④ pH 安定性

55°C、15分間の処理の場合、pH
5以上8以下で安定。

⑤ 热安定性

0.01Mリン酸緩衝液 (pH 7.2)
中、60°C、1時間のインキュベート
後でも80%以上の活性を有する。
あるいは、少なくとも1Mラクトース
を含有する同上緩衝液中、65°Cで少

なくとも24時間インキュベートした後も、80%以上の活性を有する。

(2) 放線菌に属する微生物により產生される請求項第1項記載の新規 β -ガラクトシル基転移酵素。

(3) 放線菌に属する微生物がサッカロポリスボラ(*Saccharopolyspora*)属、サモモノスボラ(*Thermomonospora*)属またはサモアクチノマイセス(*Thermactinomyces*)属に属する微生物から選ばれたものである請求項第2項記載の新規 β -ガラクトシル基転移酵素。

(4) 放線菌に属し、請求項第1項記載の新規 β -ガラクトシル基転移酵素を产生する微生物を培養し、該培養物より β -ガラクトシル基転移酵素を分離、取得することを特徴とする新規 β -ガラクトシル基転移酵素の製造法。

(5) 放線菌に属し、請求項第1項記載の新規 β -ガラクトシル基転移酵素を产生す

(式中、Galはガラクトース残基を、Glcはグルコース残基を示し、nは1~4の整数である)

で表されるガラクトオリゴ糖に変換することを特徴とするガラクトオリゴ糖含有加工乳の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

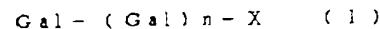
本発明は、新規な β -ガラクトシル基転移酵素、その製造法及びその用途に関するものであり、さらに詳しくは、サッカロポリスボラ属等の放線菌に属する微生物が产生し、高い熱安定性を有する新規な β -ガラクトシル基転移酵素およびその製造法並びにその利用法に関する。

[従来の技術]

糖や配糖体を更に糖で修飾することにより、それらの糖や配糖体(以下、「糖類」と略称する)に新たな生理活性や物性を付与できることが知られている。例えば、甘味度を増

す微生物がサッカロポリスボラ(*Saccharopolyspora*)属、サモモノスボラ(*Thermomonospora*)属またはサモアクチノマイセス(*Thermactinomyces*)属に属する微生物である請求項第5項記載の新規 β -ガラクトシル基転移酵素の製造法。

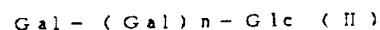
(6) 請求項第1項記載の新規 β -ガラクトシル基転移酵素を用いることを特徴とする、次の一般式(I)



(式中、Galはガラクトース残基を、Xは糖類若しくは配糖体を示し、nは0~4の整数である)

で表されるオリゴ糖または糖修飾配糖体の製造法。

(7) 請求項第1項記載の β -ガラクトシル基転移酵素を獣乳に作用させ、原料乳中の乳糖の一部または全部を一般式(II)



加せたり、苦味を緩和あるいは消去したり、水に対する溶解度の低い配糖体(漢方薬の有効成分等にその例が見られる)の水溶性を高めたり、生体内安定性や腸管吸収性を増加させたりする作用が知られている。

糖の修飾により付与される機能やその程度は、用いられる糖および修飾される糖類の種類によって異なるが、糖類をガラクトシル基で修飾することによって、上述の目的に対して好ましい効果を得られる例が多く報告されており、これに基づき様々な機能性オリゴ糖や機能性配糖体が開発されてきた。

例えば次の式



(式中、Galはガラクトース残基を、Xは糖類若しくは配糖体を示し、mは整数である)で表されるオリゴ糖または糖修飾配糖体において、Xがグルコース残基(Glu)、mが0~4の整数であるオリゴ糖(ガラクトオリゴ糖)は善玉菌内細菌であるビフィズス菌の増

種促進性物質として知られ（特開昭55-104885号）、またその優れた甘味度、甘味質、難う歯性、低カロリー性、加工安定性、保湿性、水分活性低下能、着色性などにより、食品素材として幅広く利用されつつある。

また、蔗糖のガラクトシル化により、前記式においてXがシュークロース、ロがOであるガラクトシルシュークロース（特開昭64-85090号）が、また、ラクチュロースのガラクトシル化により、前記式中、Xがラクチュロース、ロがOであるガラクトシルラクチュロース（特開昭63-94987号）がそれぞれ得られ、これらもガラクトオリゴ等と同様、新しい機能性食品素材として利用されつつある。更に、甘味配糖体ルブソシドについては、そのガラクトシル化により甘味度、甘味質の改善が達成されている（Argic. Biol. Chem. 53, 2923-2928, 1989）。

以上のように、糖類にガラクトシル基ある

一モフィラス（*Streptococcus thermophilus*, Food Chem. 10, 195-204, (1983)）起源の酵素があり、これらの酵素をラクトースに作用させることにより、実際にガラクトオリゴ糖が製造されている。また、 β -ガラクトシダーゼ活性をもつ酵母菌体の例としては、リボマイセス（*Lipomyces*）、ロドトルラ（*Rhodotorula*）、シロバシティウム（*Sirobasidium*）、ステリグマトイセス（*Sterigmostomyces*, 日本農芸化学会誌, 63巻、3号、629ページ、1989年）、スボロボロマイセス（*Sporobolomyces*, 特公昭62-208293号）、クリプトコッカス（*Cryptococcus*, 特公昭60-251896号、特公昭62-130695号、特公昭61-236790号）、クリベロマイセス（*Clavermomyces*, 特公昭61-271999号）などが知られており、これらを利用するガラクトオリゴ糖の製造も試みられている。

いはオリゴガラクトシル基を付加させ、ガラクトシル基付加物を製造するには、 β -ガラクトシダーゼのガラクトシル基転移反応が利用されている。

この反応は、高濃度の β -ガラクトビラノシド（例えばラクトース）の存在下、いくつかの β -ガラクトシダーゼが、糖（あるいは配糖体の糖部分）への β -D-ガラクトシル基転移反応を触媒するという事実に基づいている。

酵素の β -D-ガラクトシル基転移能の高さは、その起源によって様々であり、効率良く反応を進めるためには、高い転移能を持つ β -ガラクトシダーゼを用いる必要があった。

従来用いられている β -ガラクトシダーゼの例としては、糸状菌アスペルギルス・オリゼー（*Aspergillus oryzae*, 特公昭55-104885号）、細菌バチルス・サーキュラヌ（*Bacillus circulans*, 特公昭62-209780号）、ストレプトコッカス・サ

通常、 β -D-ガラクトシル基の供与体としては、ラクトースを用いるのが産業上もっとも有利である。ラクトースは牛乳中に多量に含まれ、また、海外において酪農废弃物として多量に産出され、原料としてはもっとも安価であるからである。ちなみに、 β -ガラクトシダーゼを用いた乳糖分解乳の製造が既に実用化されていること（フードケミカル、第7巻、38-44, (1986)）を背景として、転移活性の高い β -ガラクトシダーゼを用いたガラクトオリゴ糖含有加工乳の製造法が近年報告された（特開平1-168234号）。

[発明が解決しようとする課題]

ところで、一般に糖転移反応は、糖供与体（ここではラクトース）の濃度が高いほど速やかにかつ収率良く進行する。そして、このためには反応溶液中のラクトースの濃度を上げれば良いのであるが、高濃度のラクトース溶液は、常温では粘度が高いうえに結晶が析出しやすく、製造工程上の取り扱いが困

難であるという問題があった。

そこで、反応系の温度を上げて（例えは、60℃以上）、ラクトースの析出を押さえ、粘度を低下させることが求められていた。

また、溶解度を上げることにより単位体積当たりの反応物（ラクトース等）の仕込み量を多くすればコスト的にも有利であり、しかも化学反応は温度が高いほど早く進行するので、反応系の温度を上げることによって、酵素反応速度を大きくし反応時間を短縮化することも可能となる。更に、反応温度の高温化によって雑菌が成育しにくくなり、また、高温によって達成される高温度槽の高い浸透圧による酵素作用が働き、製造工程の雑菌汚染防止にも役立つことが予想される。

このように、高温によるガラクトシル基転移反応は利点が多いのであるが、このように高温で反応を行なうためには、酵素に高い熱安定性が要求される。更に、上記反応を工業的に有利に利用するためには、付加物の量

Biotechnol. 27, 383-388, 1988) が知られているが、この酵素の反応最適pHは3.5であって、例えは牛乳 (pH 7付近) 中のラクトースを利用する製造工程には不適当であった。

したがって、実際の高温酵素反応に適する酵素の提供が求められていた。

[課題を解決するための手段]

本発明者らは、高いβ-D-ガラクトシル基転移能ならびに高い熱安定性をもち、中性域で作用しうる酵素を自然界より探索した結果、放酵母に属する微生物、特にサッカロボリスボラ (*Saccharopolyspora*)、サーモモノスボラ (*Thermomonospora*) またはサーモアクチノマイセス (*Thermactinomyces*) に属する菌株中に上記の目的にかなうβ-ガラクトシル基転移酵素を生産するものがあることを見いだした。

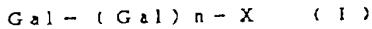
そして、これらの菌株を液体培養または固体培養することによりβ-ガラクトシル基転

移化と製造コストの低減化のために、酵素を固定化し、反応工程を自動化、連続化することが求められている。

一般に、β-ガラクトシダーゼは高濃度のラクトースにより安定化されるが、これを固定化して、高温で長期間にわたり繰り返し使用するためには、さらに高度な耐熱性が要求される。しかし、前述の糸状菌アスペルギルス・オリゼー、細菌バチルス・サーキュラシス、ストレプトコッカス・サーモフィラス起源の酵素、あるいはリボマイセス、ロドトルラ、シロバシディウム、スプロボロマイセス、クリプトコッカス、クリペロマイセスなどのβ-ガラクトシダーゼ活性をもつ酵母菌体は、熱安定性が必ずしも高くなく、高温での繰り返し使用には適切ではない。

一方、熱安定性を有し、しかも高温繰り返し使用に耐えうるβ-ガラクトシダーゼとしては、ペシロマイセス (*Pescillomyces variabilis*) の酵素 (Appl. Microbiol.

移酵素を生産させ、これを必要に即して精製純化あるいは固定化することにより、一般式 (I)



(式中、Galはガラクトース残基を、Xは糖類若しくは配糖体を示し、nは0-4の整数である)

で示されるオリゴ糖あるいは糖修飾配糖体の製造に利用することができるを見出した。

即ち、本発明は、新規なβ-ガラクトシル基転移酵素、該酵素の製造法、および該酵素の利用法を提供するものである。

本発明のβ-ガラクトシル基転移酵素は、放酵母に属する微生物、特にサッカロボリスボラ、サーモモノスボラ、サーモアクチノマイセス等に属する菌株の培養物から得ることができる。

本発明者らは、前記したように、高い熱安定性を有し、中性域で作用しうるβ-ガラクトシル基転移酵素生産菌を自然界より探索し

た結果、上記に属する菌株中に目的とするβ-ガラクトシル基転移酵素を生産するものが存在することを見いだしており、その中でも特に石川県の牧草地土壤から分離したサッカロボリスボラに属する菌株、SAM 1400株が、目的とするβ-ガラクトシル基転移酵素をとりわけ多量に生産している。

そこで、本発明において用いることができるβ-ガラクトシル基転移酵素産生菌の代表例として、微生物 SAM 1400株をあげ、その菌学的特徴を以下に述べる。

菌学的特徴：

(1) 形態学的所見

SAM 1400株は、直径 0.4~0.8 μ m の基底菌糸および気中菌糸を形成する。基底菌糸は分岐し、まれに分断が認められる。気中菌糸は分岐し、その先端に 3ないし 7 個、まれに 10 個以上の直線状の孢子連鎖を形成する。一方、気中菌糸を形成していない場合でも、基底菌糸において 2ないし 6 個の孢

裏面の色調：薄黄色

可溶性色素：なし

スターク・無機塩培地：

生育：貧弱

気中菌糸：形成せず

裏面の色調：黄色

可溶性色素：なし

チロシン・寒天培地：

生育：良好

気中菌糸：形成せず

裏面の色調：灰黄色

可溶性色素：なし

栄養寒天培地：

生育：良好

気中菌糸：かすか

裏面の色調：黄色

可溶性色素：なし

酵母エキス・麦芽エキス寒天培地：

生育：良好

気中菌糸：黄弱、白色

子嚢を、寒天培地内部、寒天培地表面、および表面より気中に向かって形成する。孢子は球状であり、その大きさは直径 0.8~1.0 μ m で、その表面は平滑である。孢子嚢、菌糸束、菌核などの構造体は、14日培養後も認められなかった。

(2) 培養所見 (55°C、14日間培養)

ショ糖・硝酸塩寒天培地：

生育：貧弱

気中菌糸：形成せず

裏面の色調：灰黄色

可溶性色素：なし

グルコース・アスパラギン寒天培地：

生育：貧弱

気中菌糸：形成せず

裏面の色調：灰黄色

可溶性色素：なし

グリセリン・アスパラギン寒天培地：

生育：良好

気中菌糸：形成せず

裏面の色調：黄褐色

可溶性色素：なし

オートミール寒天培地：

生育：良好

気中菌糸：形成せず

裏面の色調：黄色

可溶性色素：なし

NaCl 寒天培地*

生育：良好

気中菌糸：豊富、白色

裏面の色調：黄色

可溶性色素：なし

* 10% NaCl を含むトリプチケースソイプロス (BBL) + 2% 寒天培地

(3) 生理学的所見

① 生育温度範囲

1% グルコースを含む栄養寒天培地で、50°C、55°C、65°Cでの生育が認められ、トリプチケースソイプロス (BBL) + 2% 寒天培地で、30°C、37°Cでの生

育が認められた。最適生育温度は50～55°Cと思われた。

② ゼラチンの液化 (55°C)

ゼラチン液化試験用培地のいずれにおいても、生育が認められなかつた。

③ スターチの加水分解： 障 性

④ 脱脂乳の凝固： 障 性

⑤ 脱脂乳のペプトン化： 障 性

⑥ メラニン様色素の生成

ペプトン・酵母エキス・鉄寒天培地：
 障 性*

チロシン寒天培地： 障 性

トリプトン・酵母エキス寒天培地：
 障 性

*： 培地の底に、薄褐色の色素の沈降が
見られる。

⑦ 硝酸塩の還元： 障 性

⑧ 10% NaCl耐性： 障 性

⑨ グアニンの分解： 障 性

⑩ エラスチンの分解： 障 性

(アプライド マイクロバイオロジー
(Applied Microbiology), 28巻, 226ページ, 1974年) に準據して調べた結果、メソ-2,6-ジアミノピメリン酸の存在が認められた。

(b) 糖

全菌体の加水分解物中に、アラビノースとガラクトースの存在が認められた。

(c) キノン系

MK-9 (H4) を主成分として有し、そのほかにMK-9 (H6)、MK-9 (H8)、MK-10 (H4)、MK-10 (H6)、MK-10 (H8)、MK-10 (H10) を有していた。

(d) リン脂質タイプ

フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロールを含む。これは、ルシェバリエ M. P. (Lechevalier, M. P.) および H. A. ルシェバリエ (H. A. Lechevalier) (A. Dietz and D. W.

⑪ キサンチンの分解： 障 性
⑫ ヒポキサンチンの分解： 障 性
⑬ 氮素源の利用性 (ブリドハム・ゴトリープ寒天培地, 55°C, 17日間培養) :

D-グルコース	+
D-キシロース	+
ラクトース	+
L-ラムノース	±
L-アラビノース	±
D-フルクトース	+
ラフィノース	-
D-マンニトール	+
イノシトール	+
シュクロース	-

ただし、+：利用する、±：利用するか
どうか疑わしい、-：利用しない。

(4) 化学分類学的性質

(a) 2,6-ジアミノピメリン酸

全菌体を、スタネック (Staneck, J. L.)
およびロバーツ (Roberts, G. D.) の方法

Thayer (編)、アクチノマイセート タク
ソノミー (Actinomycete Taxonomy)、227-
291頁、1980年) によるP-IIIタイプに属す
る。

(e) ミコール酸

菌体内にミコール酸を含まない。

これらの結果から、SAM 1400株の
細胞壁は、メソ-2,6-ジアミノピメリン
酸とガラクトース、アラビノースを含む、
IV-Aタイプと判断される。

形態的特徴としては、SAM 1400株
は気中菌糸を形成し、分岐して平滑な球状の
胞子を連鎖上に着生する。胞子の連鎖は短
く、その数は3～7個が普通で、まれに10
個以上の胞子連鎖も認められる。その一方
で、気中菌糸の形成が認められないときには、
基底菌糸において、胞子連鎖の形成が認めら
れた。これは、基底菌糸から短い胞子柄 (認
められない場合もある) の先に2～6個の平
滑な球状の胞子が寒天培地表面より上に向か

って連鎖するものである。キノン系はM K - 9 (H 4) を主成分として有し、リン脂質タイプはP - I I Iで、ミコール酸を含まない。グアニン、ヒボキサンチン、キサンチンを分解し、エラスチンを分解せず、30～65°Cで生育し、10% NaClに耐性を示す。

以上の菌学的性質より、S. T. ウィリアムス (S. T. Williams) 編の、バージェイズ マニュアル オブ システマティック バクテリオロジー、第4巻、1989年 (Williams, S. T. (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol4, 1989) に従って、本菌株の分類学的位置を求めたところ、SAM 1400株はファエニア・レクチヴィルグラ (*Faecia rectivirgata*) に属する放線菌であることが判明した。

そこで、*F. rectivirgata* (F. rectivirgata) の基礎菌株と同種と同定された菌株2株を入手し、SAM 1400株と

培養性状、生理的性状及びキノン系の比較試験を行った。その結果を第1表に示す。

(以下余白)

第 1 表

性	SAM 1400	F. rectivirgata JCM-3057	F. rectivirgata JCM-3089	F. rectivirgata JCM-3034
水中菌糸形成能	貧弱であるが、10% NaCl添加で促進される。	貧弱であるが、10% NaCl添加で促進される。	貧弱であるが、10% NaCl添加で促進される。	貧弱であるが、10% NaCl添加で促進される。
水中菌糸の色調	白	白	白	白
可溶性色素の生成	-	-	-	-
10% NaCl存在下での生育	+	+	+	+
30°Cでの生育	+	+	-	+
65°Cでの生育	+	+	+	-
グアニンの分解	+	+	+	-
エラスチンの分解	-	-	-	-
キサンチンの分解	+	+	+	-
ヒボキサンチンの分解	+	+	+	-
硝酸塩の還元	+	+	+	+
ミルクの凝固、ペプトン化	-	-	-	-
スクレーナーの分解	-	-	-	-
ビラチンの液化	生育せず	生育せず	生育せず	-
(炭素源の利用性)				
D-グルコース	+	+	+	+
D-キシロース	+	+	+	±
ラクトース	+	+	+	-
L-ラムノース	±	-	±	-
L-アラビノース	±	-	±	-
D-フルクトース	+	+	+	+
ラフィノース	-	-	-	-
D-マンニトール	+	+	+	+
イノシトール	+	+	+	+
シュクロース	-	-	-	-
(メナキノンの組成 ¹⁾				
MK-9 (H 4)	++	+++	++	+++
MK-9 (H 5)	+	+	+	+
MK-9 (H 8)	+	-	+	痕跡
MK-10 (H 4)	+	+	+	-
MK-10 (H 5)	+	+	+	-
MK-10 (H 8)	+	-	+	-
MK-10 (H 10)	痕跡	-	+	-

* 含有するメナキノンの組成比(%)を、以下のように4段階に分けて表示した。
痕跡: < 3%、+ : 3～14%、++ : 16～49%、+++ : > 50%

第1表に示すようにSAM 1400株とF.レクチヴィルグラの基準株を含む3株は、非常に良く一致する菌学的性質を示した。

以上のことから、本発明者らはSAM 1400株をF.レクチヴィルグラであると同定した。しかしながら、コーン-ウエンデッシュ (Korn-Wendisch) ら (インターナショナル ジャーナル オブ システマティック バクテリオロジー (International Journal of Systematic Bacteriology) 39巻、430-441頁、1989年) は、菌体脂肪酸組成、キノン系、リン脂質タイプ等の化学分類的性質によつて、ファエニア属はサッカロポリスボラ属と同一であるとし、F.レクチヴィルグラをサッカロポリスボラ属に移し、新組合せ、サッカロポリスボラ・レクチヴィルグラ (*Saccharopolyspora rectivirgata*) を提唱している。

そこで、本発明者らは、コーン-ウエンデッシュら (インターナショナル ジャーナル オブ システマティック バクテリオロジー

(*Thermosporangium* sp. SAM 1547) 等が挙げられる。

これらの微生物も、それぞれ工業技術院微生物工業技術研究所に、受託番号改工研系第2769号 (FERM BP-2769)、同 2770号 (FERM BP-2770)、同 2771号 (FERM BP-2771)、同 2772号 (FERM BP-2772) として寄託されている。

上記各微生物を利用する新規β-ガラクトシル基転移酵素の製造は、常法にしたがつて当該微生物を培地に接種し、これを培養することにより行なわれる。

各菌株の培養は、通常行なわれている通気搅拌培養、並置培養、静置培養等の液体培養法もしくは固体培養法により行なうことができる。

培地は、炭素源として、ラクトース、グルコース、シエクロース、デンプンなど、窒素源としてペプトン、酵母エキス、尿素、硫酸アンモニウム、アミノ酸などを、無機塩とし

(International Journal of Systematic Bacteriology) 39巻、430-441頁、1989年) に従い、本菌株をサッカロポリスボラ・レクチヴィルグラと同定した。

なお、SAM 1400株は、サッカロポリスボラ・レクチヴィルグラ SAM 1400 (*Saccharopolyspora rectivirgata* SAM 1400) と命名され、工業技術院微生物工業技術研究所に、受託番号改工研系第2768号 (FERM BP-2768) として寄託されている。

また、他の属に属する本発明の新規β-ガラクトシル基転移酵素産生微生物の例としては、サーモアクチノマイセス sp. SAM 1544 (*Thermactinomyces* sp. SAM 1544)、サーモアクチノマイセス sp. SAM 1545 (*Thermactinomyces* sp. SAM 1545)、サーモモノスボラ sp. SAM 1546 (*Thermomonospora* sp. SAM 1546)、サーモモノスボラ sp. SAM 1547

では、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウムなどや、また必要に応じてMn²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺等の微量元素、ビオチン、チアミンなどのビタミン類等を適宜加えたものを用いる。

培養温度は生育できる温度範囲ならとくに限定されないが、50°C付近が望ましい。また、培養は、24~192時間程度行なわれる。

かくして得られた培養物から本発明のβ-ガラクトシル基転移酵素を採取するには、まず遠心分離法や遠心法などにより培養物をプロセス菌分と菌体菌分に分離する。β-ガラクトシル基転移酵素活性菌分につき、さらに阻外過濾、透析、塩析、溶媒沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、疏水性クロマトグラフィー、等電点沈殿など既知の方法を、単独あるいは組み合わせて行なうことにより、β-ガラクトシル基転移酵素の濃縮あ

るいは精製標品を得ることができる。

以上のようにして分離、精製された、本発明の β -ガラクトシル基転移酵素のうち、サッカロボリスボラ・レクチヴィルグラSAM 1400の產生する酵素の酵素化学的性質はつきのとおりである。

酵素化学的性質：

(1) 作用

転移反応：

β -D-ガラクトビラノシド

Gal-X 1モルと、ガラクトシル基受容体Y 1モルとから、あらたな β -D-ガラクトビラノシド Gal-Y 1モルと、X 1モルを生成する。

ここで、X、Yはいずれも水以外の化合物で、糖あるいはアグリコンである。

加水分解：

1モルの β -D-ガラクトビラノシ

0.1M リン酸緩衝液 (pH 5.0-8.0) における最適pHは7.2であった。

(5) 基質特異性ならびにミカエリス定数 各種の β -ガラクトビラノシドおよびその類縁体について、基質濃度1.0 mMにおける加水分解反応を行なった結果を第2表に示す。

(以下余白)

D Gal-X を加水分解し、1モルのXと1モルのガラクトースを生成する。

(2) pH 安定性

0.01M 酢酸緩衝液 (pH 3.5-6.5)、0.01M リン酸緩衝液 (pH 6.0-8.0)、あるいは0.01M ピロリン酸緩衝液 (pH 8.0-9.5) 中で55°C、15分間インキュベートし、各pHでの残存活性を測定した結果、pH 5.0以上で安定であった。

(3) 热安定性

0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で、30~80°Cで1時間インキュベートし、各温度における残存活性を測定した結果、60°Cまではほぼ安定であった。また1M ラクトースを含有する0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で、65°C、24時間処理し、残存活性を測定した結果、失活は認められなかった。

(4) 最適pH

第2表

基質 (1.0 mM)	相対活性
p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトビラノシド	100%
p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトビラノシド	0%
p-ニトロフェニル- β -D-キシロビラノシド	>1%
p-ニトロフェニル- β -D-フルコシド	>1%
p-ニトロフェニル- β -D-マンノシド	0%
ラクトース	161%

(6) 分子量

TSK-G3000 SW-Xカラムを用いた高速液体ゲルクロマトグラフィー(移動相: 0.15M KClを含む0.01Mリン酸緩衝液 pH 7.2, 流速: 1.0 ml/min)により、オリエンタル酵母社製の各種標準タンパク質との相対溶出保持時間から分子量を求めた結果、本酵素の分子量は140,000±20,000であった。

(7) サブユニット分子量およびサブユニット構造

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法により本酵素のサブユニットの分子量を求めたところ、140,000±20,000であった。ファスト-ゲル(Phast-Gel)電気泳動装置を用い、各種標準蛋白質との相対移動度から求めた。本酵素は単量体と思われる

(8) 阻害剤

本酵素はHg²⁺, Cu²⁺, などの金属イオンおよびエチレンジアミン四酢酸により阻害

(9) 活性測定

p-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドの加水分解の活性測定は、基質の加水分解により生成するp-ニトロフェノールを分光学的に追跡することにより行なった。

すなわち、0.01Mのp-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドを含有する0.01Mリン酸緩衝液(pH7.2)0.6mlに、0.10mlの酵素液を加え、405nmにおける吸光度の増加を55°Cにおいて追跡した。p-ニトロフェノールの生成量(μmol)を、pH 7.2におけるp-ニトロフェノールの分子吸光係数($\epsilon_{405} = 1.34 \times 10^4$)を用いて計算により求めた。p-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドの加水分解により定義した酵素1単位(pNPGU)は、1分間に1μmolのp-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドを加水分解する酵素量である。ラクトースの加水分解の活性測定は、基質の分解により生成するグルコースを分光

された(第3表)。

第3表

化 合 物	残存活性
CdCl ₂	96%
ZnCl ₂	122%
CaCl ₂	87%
BaCl ₂	96%
NiCl ₂	59%
MnCl ₂	103%
CoCl ₂	97%
FeCl ₂	87%
CuCl ₂	28%
EDTA	5%
2-メルカプトエタノール	96%
DTNB	107%
モノヨード酢酸	69%

学的に定量することにより行なった。すなわち、0.1Mのラクトースを含有する0.01Mリン酸緩衝液(pH7.2)0.90mlに、0.10mlの酵素液を加え、55°Cで10分間反応させ、33%トリクロロ酢酸0.05mlを加えて反応を停止させた。反応停止させた上記反応液0.1mlに、ペーリンガーマンハイム社製グルコース定量キット1.0mlを加え、室温で45分間放置したのち、660nmにおける吸光度を測定した。ラクトースの加水分解により定義した酵素1単位(LE)は、1分間に1μmolのラクトースを加水分解する酵素量である。

本発明のβ-ガラクトシル基転移酵素は、上記の酵素化学的諸性質から新規であると判断された。

[実施例]

次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

実施例 1

ラクトース 3.0%、アミノサン V 3 (諸
菜抽出物) 1.4%、グルタミン酸 1 ナトリ
ウム塩 0.2%、酵母エキス 0.1%、リン
酸 1 カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム
0.05%を含有する培地(pH7.2) 100mlず
つを 500mlマイヤーフラスコにいれ、
120°C 1 気圧にて 15 分間オートクレー
ブ殺菌したものの、SAM 1400 株を 1
白金耳ずつ植菌し、55°Cにて 120 時間通
気搅拌培養した。培養終了後、培養物を遠
心処理して得た上清 2.2 ml を、10mM リン
酸緩衝液 (pH7.2) で平衡化したイオン交換
樹脂セパビーズ (SEPA BEADS) EP-DA13カラ
ム (三重化成製、5cm X 20cm) に負荷し、上
記緩衝液、次いで 0.3M 塩化カリウムを含
有する上記緩衝液でカラムを洗浄後、0.5
M 塩化カリウムを含有する上記緩衝液にて
β-ガラクトシル基転移酵素を溶出した。活性
部分を紫外線吸収法にて濃縮し、10mM リ

(pH7.2) に対して透析した。

以上の操作によりえられた精製 β-ガラク
トシル基転移酵素の総活性は 240 pNPGU、
比活性は 10 pNPGU/ml であった。

実施例 3

ラクトース 5g を 0.05M 酢酸緩衝液
(pH6.0) に溶解して 10ml とし、これに実施
例 1 で得られた β-ガラクトシル基転移酵素
標準品 10 pNPGU を加え、65°C で 4 時間
反応させた。反応液を 5°C で 5 分間処理
して反応を停止させ、1 部分を 10 倍に希釈
してこれをショーデックス・イオンパック
KS 801 カラムを用いた高速液体クロマト
グラフィー (移動相、水; カラム温度、70
°C; 流速、1 ml/min; 検出、示差屈折計) で
分析することにより、反応液の糖組成を決定
した。反応液には、7% の四糖以上の大
分子糖、21% の三糖類、48% の二糖類、及
び 24% の单糖類 (いずれも全糖に対する重

量 %) が含まれていた。

実施例 2

上記透析内液を、10mM リン酸緩衝液 (pH
7.2) で平衡化したイオン交換樹脂 DEAE
-セファロース (DEAE-Sephadose) CL-6
B (ファルマシア製、2.8cm X 20cm) に負荷
し、上記緩衝液、次いで、0.2M 塩化カリ
ウムを含有する上記緩衝液にてカラムを洗浄
後、0.2M から 0.6M の塩化カリウムの直
線濃度勾配 (総量 400ml) をかけることによ
り β-ガラクトシル基転移酵素を溶出した。
活性部分を紫外線吸収法にて濃縮した後、
0.15M 塩化カリウムを含む 10mM リン
酸緩衝液 (pH7.2) で平衡化した TSK ゲル
G 3000 SW-XL (東ソー製) に、濃
縮液を数回に分けて負荷し、クロマトグラフ
ィーを行なった (流速、1.0 ml/min; 検出、
280nm における吸光度)。活性部分を紫外
線吸収法にて濃縮し、10mM リン酸緩衝液

液体クロマトグラフィー（移動相、水；カラム温度、70°C；流速、1 ml/min；検出、示差屈折計）で分析することにより、反応液の糖組成を決定した。反応液には、3%の四糖以上のオリゴ糖、25%の三糖類、58%の二糖類、及び14%の单糖類（いずれも全糖に対する重量%）が含まれていた。また、以上の反応を1サイクルとしてこれを繰り返し、固定化 β -ガラクトシル基転移酵素の活性半減期を1次反応に従うものとして計算により求めたところ、固定化 β -ガラクトシル基転移酵素の活性半減期は少なくとも300サイクル以上と求められた。

実施例 5

サーモモノスボラ s.p. SAM 1546、同 s.p. SAM 1547、サーモアクチノマイセス s.p. SAM 1544 および同 s.p. SAM 1545 の4菌株を、500 ml のフラスコ中、100 ml のラクトース

3%、ペプトン 0.2%、酵母エキス 0.02%、 KH_2PO_4 0.2%、 NaCl 0.3% および $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01% を含む培地 (pH 7.2) を用い、55°Cで4日間振盪培養して β -ガラクトシル基転移酵素を得た。

得られた β -ガラクトシル基転移酵素は、それぞれ第4表に示すような性質を有するものであった。

(以下余白)

第4表

特 性	菌 株	サーモモノスボラ s.p. SAM 1546	サーモモノスボラ s.p. SAM 1547	サーモアクチノマイセス s.p. SAM 1544	サーモアクチノマイセス s.p. SAM 1545
(作用)					
β-ガラクトシル基転移反応 ^{**}	+	+	+	+	+
加水分解 ^{**}	+	+	+	+	+
(加水分解の基質特異性)					
ラクトース ^{**}	+	+	+	+	+
β -ニトロフェニル- β -ガラクトシド ^{**}	+	+	+	+	+
β -ニトロフェニル- α -ガラクトシド ^{**}	-	-	-	-	-
最適 pH ^{**}	6.0~7.5	6.0~7.5	6.0~7.5	6.0~7.5	6.0~7.5
pH 安定性 ^{**}	5~8	5~8	5~8	5~8	5~8
熱安定性 ^{**}	約 82%	約 82%	約 88%	約 88%	約 88%

(注) + : 触媒する。- : 触媒しない。

*1 : 1 M ラクトースを含有する 1.0 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、55°Cで 240 分反応させた。

*2 : 1.0 mM ラクトースを含有する 1.0 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、55°Cで 10 分反応させた。

*3 : 1.0 mM β -ニトロフェニル- β -ガラクトシドを含有する 1.0 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、55°Cで 5 分反応させた。*4 : 1.0 mM β -ニトロフェニル- α -ガラクトシドを含有する 1.0 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、55°Cで 5 分反応させた。*5 : 1.0 mM β -ニトロフェニル- β -ガラクトシドを含有する 1.0 mM の酢酸緩衝液 (pH 6.0~8.5) あるいはリン酸緩衝液 (pH 6.0~8.5) 中、55°Cで 5 分反応させた。

*6 : 1.0 mM の酢酸緩衝液 (pH 6.0~8.5) あるいはリン酸緩衝液 (pH 6.0~8.5) 中、55°Cで 1.5 分間インキュベートした後、直ちに氷冷し、残存活性を 0% の条件で測定して求めた。

*7 : 1.0 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、60°Cで 1 時間インキュベートした後、直ちに氷冷し、残存活性を 0% の条件で測定して求めた。

実施例 6

アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 起源のラクターゼ (ヤクルト本社製、ラクターゼY-AO)、バシリス・サーキュランス (*Ascielles circulans*) 起源のラクターゼ (大和化成製、ビオラクタ)、および本発明の β -ガラクトシル基転移酵素を、それぞれ 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、0.1 mg/ml の溶液を調製した。各酵素溶液を 60 °C で 1 時間インキュベートした後、ただちに氷冷した。次いで、各酵素の残存活性をそれぞれの説明書に記載してある最適条件に従い測定した結果、アスペルギルス・オリゼー起源のラクターゼ、バシリス・サーキュランス起源のラクターゼ、および本発明の β -ガラクトシル基転移酵素の残存活性は、それぞれ 1%、1% および 96% であった。

実施例 7

ラクトース 0.5 g を 0.05 M 酢酸緩衝

% の 3 糖類、4.8 ~ 5.2% の 2 糖類および 2.1 ~ 2.6% の単糖類 (いずれも全糖に対する重量%) が含まれていた。

実施例 8

サッカロボリスボラ・レクチヴィルグラ (*Saccharopolyspora rectivirgata*) の β -ガラクトシル基転移酵素を利用した、ガラクトオリゴ糖を含有する乳糖分解乳の製造：

牛乳 (乳糖濃度 4.8%、無脂乳固形分濃度 8.3%) を 60 °C で加温し、これにサッカロボリスボラ・レクチヴィルグラから得た β -ガラクトシル基転移酵素を乳糖 1 gあたり 1.6 ~ 2.4 LU 添加し、4 ~ 7 時間反応させた。次いでショーデックス・イオンパック KS 801 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (移動相、水；カラム温度、70 °C；流速、1.0 ml/min；検出、示差屈折計) により、上記処理後の牛乳中の

溶液 (pH 5.0) に溶解した溶液に、サモモノスボラ sp. SAM 1546、サモモノスボラ sp. SAM 1547、サモモアクチノマイセス sp. SAM 1544 およびサモモアクチノマイセス sp. SAM 1545 の各培養物より得た β -ガラクトシル基転移酵素、1 PNP GU を加えて最終容量 1.0 ml とし、65 °C で 8 時間反応させた。

反応液を 95 °C で 5 分間処理して反応を停止させ、1 部分を 10 倍に希釈してこれをショーデックス・イオンパック KS-801 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (移動相、水；カラム温度、70 °C；流速、1 ml/min；検出、示差屈折計) で分析することにより反応液の糖組成を決定した。

この結果、いずれの起源の β -ガラクトシル基転移酵素を用いた場合でも、反応液には 3 ~ 7% の 4 糖以上のオリゴ糖、1.8 ~ 2.1

糖組成を分析した。その結果は第 5 表のとおりであった。なお、ガラクトシル基転移酵素のラクトース加水分解活性は、上記反応後もほぼ 100% 残存していた。

第 5 表

糖組成	測定条件 (酵素濃度、反応時間)		
	未処理 100.0	100.0 7 時間	100.0 4 時間
3 糖以上のオリゴ糖	0.000	10.700	11.4 (D)
2 糖類 (%)	100.0	23.3	24.8
单糖類	0.0	66.0	63.6

実施例 9

ガラクトオリゴ糖を含有する乳糖分解乳の製造における、サッカロボリスボラ・レクチヴィルグラから得た β -ガラクトシル基転移酵素の牛乳中での安定性をさらに詳しく調べた。

第 6 表

温度 溫度 (°C)	持続時間 (時間)	酵素の残存活性(%)	
		S.レクテヴィルグラ	B.サーキュラス
60	0	100	100
	1	100	77
	2	100	78
	4	100	78
	8	100	71
	0	100	100
65	1	100	38
	2	100	15
	4	100	0
	8	100	0
	0	100	100
	1	80	3
70	2	80	0
	4	80	0
	8	11	0

以 上

出 請 人 サントリー株式会社

代理 人 弁理士 小 野 信



第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁵

識別記号

府内整理番号

//(C 12 N 9/10
C 12 R 1:01)

⑥発明者 中 尾 正 宏 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内

⑥発明者 柴 野 裕 次 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内

⑥発明者 天 知 輝 夫 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内

手続補正書(自発)

平成2年11月8日

特許庁長官 植松 敏哉

1. 事件の表示

平成2年特許願 第246792号

2. 発明の名称

新規耐熱性β-ガラクトシル基転移酵素、その製造法
及びその用途

3. 補正をする者

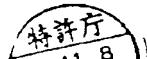
事件との関係 出願人
名 称 (190) サントリー株式会社

4. 代理人

住 所 東京都千代田区神田佐久間町3丁目15番
西井ビル7階 (〒101)
電話 03-5887-9870
氏 名 (8632) 井理士 小野信

5. 補正命令の日付

自 発



11.8.1

(7) 同 第15頁、第6行
「目的とするβ-ガラクトシル」とあるを
「目的とする耐熱性β-ガラクトシル」と訂正する。(8) 同 第30頁、第3行
「のβ-ガラクトシル」とあるを
「の耐熱性β-ガラクトシル」と訂正する。(9) 同 第32頁、第3行
(5) 基質特異性ならびにミカエリス定数」とあるを
(5) 基質特異性」と訂正する。(10) 同 第33頁、第2表中、第3段
「p-ニトロフェニル-β- > 1%」とあるを
「p-ニトロフェニル-β- < 1%」と訂正する。(11) 同 第33頁、第2表中、第4段
「p-ニトロフェニル-β- > 1%」とあるを
「p-ニトロフェニル-β- < 1%」と訂正する。(12) 同 第37頁、第3行
「0.0.1M」とあるを
「0.0.1M」と訂正する。

6. 補正の対象

昭細書の「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容

(1) 昭細書中、第7頁、第15行
「等と同様」とあるを
「被と同様」と訂正する。

(2) 同 第11頁、第12行
「成育しにくくなり」とあるを
「成育しにくくなり」と訂正する。

(3) 同 第13頁、第20行
「によりβ-ガラクトシル」とあるを
「により耐熱性β-ガラクトシル」と訂正する。

(4) 同 第14頁、第10行
「新規なβ-ガラクトシル」とあるを
「新規な耐熱性β-ガラクトシル」と訂正する。

(5) 同 第14頁、第13行
「本発明のβ-ガラクトシル」とあるを
「本発明の耐熱性β-ガラクトシル」と訂正する。

(6) 同 第15頁、第1行
「目的とするβ」とあるを
「目的とする耐熱性β」と訂正する。

手続補正書(自発)

平成2年12月28日

特許庁長官 植松 敏哉

1. 事件の表示
平成2年特許願 第246792号2. 発明の名称
新規耐熱性β-ガラクトシル基転移酵素、その製造法
及びその用途

3. 補正をする者

事件との関係 出願人
名 称 (190) サントリー株式会社4. 代理人
住 所 東京都千代田区神田佐久間町3丁目15番
西井ビル7階 (〒101)
氏 名 (8632) 井理士 小野信

5. 補正命令の日付

自 発



2.12.28

6. 補正の付録 「図面への簡単な説明」の付

相應書の「発明の詳細な説明」の欄および図面

7. 補正の内容

(1) 附圖書中、第50頁、第6表の次に行を挿えて次の文を挿入する。

「実験例 10

耐熱性 β -ガラクトシル基胚芽酵素を緩衝液A、Bに対して4°Cで一晩過析した。また、耐熱性 β -ガラクトシル基胚芽酵素をエチレンジアミン四酢酸(EDTA、純度、1 mM)と4°Cで1時間インキュベート後、緩衝液Cに対して4°Cで一晩過析した。

各過析内液を、80°Cで5、10、30、60、120、240分間加熱処理し、各時間ごとにその一定量をサンプリングした後、ただちに氷冷し、 μ -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを基質として「酵素化学的性質(9)」に記載した方法に基づき酵素の残存活性を測定した。

なお、緩衝液Cは0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.2)であり、緩衝液A、Bは20 μM MnCl₂およ

び20 μM ZnCl₂をそれぞれ含む緩衝液である。

得られた結果を第1図に示す。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、マンガンおよび亜鉛イオンが熱安定性に及ぼす作用を示す図面である。

(2) 第1図を別紙の通り追加する。

第 1 図

